

# INTRODUCTION OF GENE AND DEVICE THEREFOR

## Bibliographic data

Mosaics

Original document

INPADOC legal status

Publication number: JP9248183

Publication date: 1997-09-22

Inventor: ICHIKAWA MASAYOSHI; KIKUTA MASATO; MURAMATSU TATSUO

Applicant: KANSAI PAINT CO LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12M1/00; C12N15/09; C12M1/00; (IPC1-7): C12N15/09; C12M1/00

- European:

Application number: JP19960081946 19960312

Priority number(s): JP19960081946 19960312

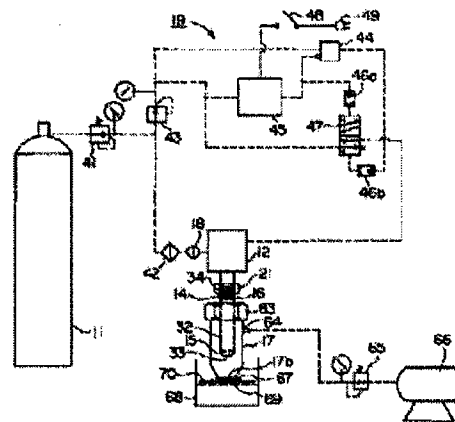
View INPADOC patent family

View list of citing documents

Report a data error here

## Abstract of JP9248183

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To efficiently introduce genes into cells without damaging the cells by shooting a bullet having gene-carrying fine particles adhered to the surface from an automatic gun with a high pressure compressed gas charged in a high pressure compressed gas chamber by the operation of an on-off valve. **SOLUTION:** This method for introducing genes into cells comprises shooting a bullet 14 having gene-carrying fine particles adhered to the surface from an automatic gun 12 with a high pressure compressed gas stored in a high pressure compressed gas chamber, colliding the shot bullet with a tip stop part 15 of a nozzle 16 connected to the automatic gun 12, separating the gene-carrying fine particles from the bullet 14 with the collision, dashing out the fine particles from the blowout holes 33 of the nozzle 16 and striking the gene-carrying fine particles into cells 67 disposed at places near to the blowout holes 33. Therein, an on-off valve 18 disposed in a line from the high pressure compressed gas source 11 to the high pressure compressed gas chamber of the automatic gun 12 is opened to supply the high pressure compressed gas into the high pressure compressed gas chamber of the automatic gun 12, and the on-off valve 18 is subsequently closed. The bullet 14 is shot from the blowout holes 33 with the high pressure compressed gas stored in the high pressure compressed gas chamber to introduce the genes into the cells.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-248183

(43) 公開日 平成9年(1997)9月22日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A

審査請求 未請求 請求項の数21 F D (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平8-81946

(22) 出願日 平成8年(1996)3月12日

(71) 出願人 000001409

関西ペイント株式会社

兵庫県尼崎市神崎町33番1号

(72) 発明者 市川 正義

神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関

西ペイント株式会社内

(72) 発明者 菊田 真人

神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関

西ペイント株式会社内

(72) 発明者 村松 達夫

愛知県豊橋市大岩町北田45番地

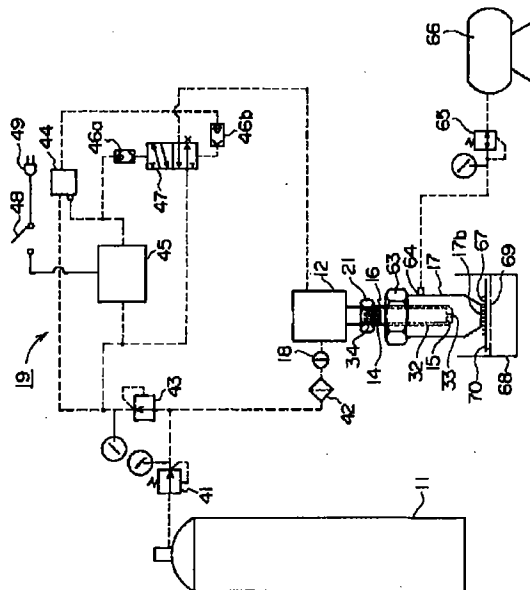
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 遺伝子導入方法及びその装置

(57) 【要約】

【課題】 広範囲の細胞に使用でき、細胞に損傷を与えることなく遺伝子を直接細胞内に導入でき、安全に使用でき、小型化された遺伝子導入方法及びその装置を提供する。

【解決手段】 高圧圧縮気体を噴射することにより自動ガンで弾丸を発射する。高圧圧縮気体源から自動ガンの高圧圧縮気体導入口に至るライン内に手動で開閉するオンオフ・バルブを設ける。オンオフ・バルブを開いて高圧圧縮気体源から自動ガンに高圧圧縮気体を供給する。次いでオンオフ・バルブを閉じた後に、高圧圧縮気体を噴射して、弾丸を発射する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、高圧圧縮気体室に貯蔵された高圧圧縮気体を用いて自動ガンから発射し、該自動ガンに接続されたノズルの先端のストップ部に衝突させ、その衝撃で該遺伝子担持微粒子を該弾丸から分離させ、該ノズルの噴出孔から飛出させて、該遺伝子担持微粒子を該噴出孔の近傍に配置された細胞中に打ち込む遺伝子導入方法において、

該高圧圧縮気体源から該自動ガンの該高圧圧縮気体室に至るライン内に設けられたオンオフ・バルブを開いて、該高圧圧縮気体源から該自動ガンの該高圧圧縮気体室に該高圧圧縮気体を供給し、次いで該オンオフ・バルブを閉じた後に、該弾丸を、該自動ガンの該高圧圧縮気体室に貯蔵された該高圧圧縮気体を用いて該噴射孔から発射することを特徴とする遺伝子導入方法。

【請求項2】 高圧圧縮気体源から供給される高圧圧縮気体を貯蔵する高圧圧縮気体室と、該高圧圧縮気体室に貯蔵された該高圧圧縮気体を噴射する噴射孔とを備えた自動ガンと、

遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、自身の一端から他端まで誘導する筒部と、該筒部の他端において該弾丸を制止するストップ部と、該弾丸に付着していた該微粒子の飛出しを許容する噴出孔とを備えた、該自動ガンの該噴射孔側の一端に取付けられたノズルとを具備し、

該自動ガンの該噴射孔を開いて、該高圧圧縮気体を噴射し、該弾丸を発射して該ノズルの該ストップ部に衝突させ、該ノズルの該噴出孔から飛出した該遺伝子担持微粒子を、該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込む遺伝子導入装置において、

該高圧圧縮気体源から該自動ガンの該高圧圧縮気体室に至るライン内に設けられたオンオフ・バルブを具備することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項3】 飛出した該微粒子の移動方向に沿った開孔を有するチャンバーを該ノズルに着脱自在に接続して具備する請求項2記載の遺伝子導入装置。

【請求項4】 該チャンバーと該ノズルとの間に配置されたパッキングと、該パッキングを圧縮して、該パッキングを該ノズルに圧接せしめて該ノズルに対して該チャンバーを固定する、該ノズルに係合しているナットとを具備する請求項3記載の遺伝子導入装置。

【請求項5】 該チャンバー内に、真空ポンプに接続された真空口を具備する請求項3記載の遺伝子導入装置。

【請求項6】 該チャンバー内の一端に、飛出した該遺伝子担持微粒子を受けるための受け台が着脱自在に取付けられている請求項3記載の遺伝子導入装置。

【請求項7】 該受け台に、該真空ポンプに接続された真空口を具備する請求項6記載の遺伝子導入装置。

【請求項8】 該チャンバー内に気体逃がし口を具備す

る請求項3記載の遺伝子導入装置。

【請求項9】 高圧圧縮気体源から供給される高圧圧縮気体を貯蔵する高圧圧縮気体室と、該高圧圧縮気体室に貯蔵された該高圧圧縮気体を噴射する噴射孔と、低圧圧縮気体源から供給される低圧圧縮気体を収容する低圧圧縮気体室と、該噴射孔を閉じ且つ該低圧圧縮気体室に供給された該低圧圧縮気体の圧力で該噴射孔から離れる弁部材とを備えた自動ガンと、

遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、自身の一端から他端まで誘導する筒部と、該筒部の他端において該弾丸を制止するストップ部と、該弾丸に付着していた該微粒子の飛出しを許容する噴出孔とを有する、該自動ガンの該噴射孔側の一端に取付けられたノズルとを具備し、

該低圧圧縮気体の圧力で該自動ガンの弁部材を該噴射孔から離して該噴射孔を開いて、該高圧圧縮気体を噴射し、該弾丸を発射して該ノズルの該ストップ部に衝突させ、該ノズルの該噴出孔から飛出した該遺伝子担持微粒子を、該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込む遺伝子導入装置において、

該自動ガンの該低圧圧縮気体室への該低圧圧縮気体の供給時間を制御して、該自動ガンの噴射孔の開く時間を制御することにより、該高圧圧縮気体の噴射時間を制御する制御手段を具備し、該制御手段が、予め設定された時間のみ低圧圧縮気体を供給するコントローラーと、該コントローラーから該低圧圧縮気体が供給されている間、該低圧圧縮気体を該自動ガンに供給する空気作動弁と、該コントローラーからの該低圧圧縮気体の供給が停止すると該自動ガンと該空気作動弁の間における該低圧圧縮気体を該空気作動弁から急速に排気せしめる手段からなることを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項10】 該低圧圧縮気体が、該高圧圧縮気体源から該自動ガンに至るライン内から分岐したライン内において該高圧圧縮気体を低圧調整用レギュレータで減圧することにより得られる請求項9記載の遺伝子導入装置。

【請求項11】 該ノズルの該筒部の内面に設けられた可撓性のチューブと、該チューブに接続された該チューブ内の気体量を制御する制御手段とを具備し、該チューブの内径が、該制御手段から気体を供給されたときには、該弾丸の外径よりも小さく、気体が排気されたときには、該弾丸の外径よりも大きく、該高圧圧縮気体の噴射による該自動ガンの発射と、該チューブ内の気体の排気による該弾丸の取外しとを同調させた請求項9記載の遺伝子導入装置。

【請求項12】 高圧圧縮気体源から供給される高圧圧縮気体を貯蔵する高圧圧縮気体室と、該高圧圧縮気体室に貯蔵された該高圧圧縮気体を噴射する噴射孔と、該噴射孔を開閉する弁部材とを備えた自動ガンと、 遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸

を、自身の一端から他端まで誘導する筒部と、該筒部の他端において該弾丸を制止するストップ部と、該弾丸に付着していた該微粒子の飛出しを許容する噴出孔とを有する、該自動ガンの該噴射孔側の一端に取付けられたノズルとを具備し、

該自動ガンの該弁部材を該噴射孔から離して該噴射孔を開いて、該高圧圧縮気体を噴射し、該弾丸を発射して該ノズルの該ストップ部に衝突させ、該ノズルの該噴出孔から飛出した該遺伝子担持微粒子を、該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込む遺伝子導入装置において、該高圧圧縮気体源から該自動ガンの高圧圧縮気体室に至るライン内に設けられたオンオフ・バルブと、該オンオフ・バルブが閉じているときだけ、該弁部材が該噴射孔から離れることを可能にする安全手段を具備することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項13】 高圧圧縮気体を噴射する噴射孔を備えた自動ガンと、該自動ガンの一端に取付けられたノズルとを具備し、

該ノズルが、遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、自身の一端から他端まで誘導する筒部と、該筒部の他端において該弾丸を制止するストップ部と、該弾丸に付着していた該微粒子の飛出しを許容する噴出孔とを備えており、

該自動ガンの噴射孔を開いて、該高圧圧縮気体を噴射し、該弾丸を発射して該ノズルの該ストップ部に衝突させ、該ノズルの該噴出孔から飛出した該遺伝子担持微粒子を、該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込むようにした遺伝子導入装置において、

該ノズルの該筒部の内面に設けられた、該弾丸の外径よりも小さな内径部分を有する弾性部材を具備することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項14】 高圧圧縮気体を噴射する噴射孔を備えた自動ガンと、該自動ガンの一端に取付けられたノズルとを具備し、

該ノズルが、遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、自身の一端から他端まで誘導する筒部と、該筒部の他端において該弾丸を制止するストップ部と、該弾丸に付着していた該微粒子の飛出しを許容する噴出孔とを備えており、

該自動ガンの噴射孔を開いて、該高圧圧縮気体を噴射し、該弾丸を発射して該ノズルの該ストップ部に衝突させ、該ノズルの該噴出孔から飛出した該遺伝子担持微粒子を、該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込む遺伝子導入装置において、

該ノズルの該筒部の内面に設けられた可撓性のチューブと、該チューブに接続された該チューブ内の気体量を制御する制御手段とを具備し、該チューブの内径が、該制御手段から気体を供給されたときには、該弾丸の外径よりも小さく、気体が排気されたときは、該弾丸の外径よりも大きいことを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項15】 該制御手段が、気体源から該チューブ内に気体を供給するライン内に設けられた開閉バルブと、コントローラーと、該コントローラーに接続された空気作動弁及びNOT素子とを含んでなる請求項14記載の遺伝子導入装置。

【請求項16】 高圧圧縮気体を噴射する噴射孔を備えた自動ガンと、該自動ガンの一端に取付けられたノズルとを具備し、

該ノズルが、遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、自身の一端から他端まで誘導する筒部と、該筒部の他端において該弾丸を制止するストップ部と、該弾丸に付着していた該微粒子の飛出しを許容する噴出孔とを備えており、

該自動ガンの噴射孔を開いて、該高圧圧縮気体を噴射し、該弾丸を発射して該ノズルの該ストップ部に衝突させ、該ノズルの該噴出孔から飛出した該遺伝子担持微粒子を、該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込む遺伝子導入装置において、

円筒形の該弾丸が発射された場合に該弾丸を制止するノズル先端のストップ部が該ノズルの軸方向に対して垂直に平面状に形成されている、弾丸の変形防止手段を具備することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項17】 遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、自動ガンで発射し、該自動ガンに接続されたノズルの先端のストップ部に衝突させ、その衝撃で該遺伝子担持微粒子を該弾丸から分離させ、該ノズルの噴出孔から飛出させて、該遺伝子担持微粒子を該噴出孔の近傍に配置した細胞中に打ち込むようにした遺伝子導入方法に使用される弾丸において、該微粒子を付着させる表面が、該微粒子を該弾丸の該表面から容易に分離させるための表面処理を施されていることを特徴とする弾丸。

【請求項18】 該表面処理がフッ素樹脂・コーティングである請求項17記載の弾丸。

【請求項19】 該表面処理が粗面化処理である請求項17記載の弾丸。

【請求項20】 該表面処理が、フッ素樹脂・コーティング及び粗面化処理の両者である請求項17記載の弾丸。

【請求項21】 該表面処理がメチル基処理である請求項17記載の弾丸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、外来遺伝子を細胞内に直接導入することが可能な遺伝子導入方法及びその装置並びに表面処理が施された弾丸に関し、更に詳細には、遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を自動ガンで発射して、ノズルのストップ部に衝突させ、ノズルの噴出孔から飛出した微粒子を細胞に打ち込み、微粒子上の遺伝子を細胞に直接導入する遺伝子導入方法及びそ

の装置、並びに微粒子を弾丸の表面から分離させるための表面処理が施された弾丸に関する。

#### 【0002】

【従来の技術及びその課題】従来、外来遺伝子を細胞内に導入するための方法として、リン酸カルシウム、マイクロインジェクション法等多くの方法が開発されているが、それらは植物細胞をプロトプラスト化してから操作する方法であった。すなわち、植物細胞においては、その構造上プロトプラスト（細胞壁を取り外した裸細胞）の状態において操作しないと、うまく遺伝子を導入することができず、また、遺伝子導入後のプロトプラストから細胞壁をもつ通常の植物体に再生することが困難であった。

【0003】そのため、最近、植物細胞に直接遺伝子を導入する方法として、銃を用いるパーティクル・ガン法（遺伝子銃法）が開発されてきている。

【0004】これらパーティクル・ガン法のうち、火薬銃式法は、遺伝子を担持した金属微粒子を表面に付着させた弾丸を、火薬の爆発力により発射させ、ストッププレートに衝突させ、微粒子を飛ばして細胞内に打込む方法であるが、火薬の取り扱いが銃刀法で規制され、制御、及び使用後の清掃滅菌作業が複雑且つ困難である等の問題がある。

【0005】また、実開平1-90393号公報には、シリンダの一端に装着させた弾丸を、火薬に代えて圧縮ガスで発射させ、ストップ部に衝突させ、遺伝子担持微粒子を飛ばして細胞内に打込む装置が提案されている。しかし、実開平1-90393号公報に記載された装置においては、弾丸のシリンダへの装着手段が載置にすぎないため、シリンダの長手方向がほぼ水平方向に制限される結果、微粒子の噴射方向もほぼ水平方向に制限される問題；シリンダ先端から圧縮気体と共に噴出する遺伝子担持微粒子の一部が周囲に飛散し汚染の原因となる問題；圧縮ガスを開閉する開閉弁以外には遺伝子担持微粒子の噴射速度を調節する手段がないため、ターゲット細胞に応じて噴射速度を調節するのが困難である問題等がある。

【0006】上記の問題に加えて、従来のパーティクル・ガン法には一般に次のような問題もある。すなわち、安全性の確保等の観点から装置が大型化し、コストが高くなり、操作が複雑である問題がある。また、弾丸の装着を両面テープ等で行っていることが多いため、弾丸の装着操作が煩雑であるとともに、発射前に弾丸をシリンダに確実に保持することが困難であり、それ故、弾丸の噴出方向が水平方向等のほぼ一定方向に制限され、遺伝子を生体に直接導入すること（*in vivo*法）が困難である問題がある。更に、弾丸と遺伝子担持微粒子との付着力が強過ぎ且つ変動し易いため、弾丸がストッププレートに衝突した際に、弾丸から噴出する遺伝子担持微粒子の量が少なく且つばらつきが多く、それ故、

ターゲット細胞に導入される遺伝子の量が少なく、すなわち発現効率が悪くなり、ばらつきも多くなる問題もある。更にまた、図1に示されるように、シリンダ1のストッププレート2の内表面2aの形状が一般にテーパー状に形成され、その部分に衝突する弾丸3の形状たる円筒状と適合しないため、弾丸の衝突部分の変形・損傷が激しく、弾丸を1回で使い捨てており、繰り返し使用できず、コスト面での問題もあった。

【0007】一方、本出願人等は、特開平3-251187号公報及び特開平6-62821号公報で、弾丸を用いることなく、圧縮気体とともに、遺伝子担持微粒子をノズル先端部から噴出させて、細胞内に打込む方法を提案している。しかし、特開平3-251187号公報及び特開平6-62821号公報に記載された方法では、遺伝子担持微粒子とともに噴出される気体流によってターゲット細胞が激しく損傷される一方、細胞の損傷を抑制するために気体の噴出速度を小さくすると、遺伝子を細胞に十分に導入できなくなる問題がある。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】最近、遺伝子工学の急速な進歩に伴い、患者の細胞に直接遺伝子を導入する遺伝子治療法等が注目されている状況下、柔らかな細胞から固い（プロトプラスト化されていない）植物細胞に至る広範囲の細胞に使用でき、しかも生体（*in vivo*法）にも取出し細胞（*in vitro*法）にも使用でき、細胞に損傷を与えることなく且つ高い発現効率で遺伝子を直接細胞内に導入でき、ターゲット細胞に応じて遺伝子担持微粒子の噴出時間、噴出速度、噴出距離を容易に変えることができ、遺伝子担持微粒子の噴出方向に制限がなく、取扱いが容易で、安全に使用でき、小型化された遺伝子導入方法及び装置の開発、弾丸の装着が容易で且つ弾丸の保持が確実にでき、弾丸の変形を防止できる遺伝子導入方法及び装置の開発、並びに高い発現効率で遺伝子を細胞に導入できる弾丸の開発が強く望まれている。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明に従うと、上記のとおり課題を解決するために、遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子を表面に付着させた弾丸を、高圧圧縮気体室に貯蔵された高圧圧縮気体を用いて自動ガンから発射し、自動ガンに接続されたノズルの先端のストップ部に衝突させ、その衝撃で遺伝子担持微粒子を弾丸から分離させ、ノズルの噴出孔から飛出させて、遺伝子担持微粒子を噴出孔の近傍に配置された細胞中に打ち込む遺伝子導入方法において、高圧圧縮気体源から自動ガンの高圧圧縮気体室に至るライン内に設けられたオンオフ・バルブを開いて、高圧圧縮気体源から自動ガンの高圧圧縮気体室に該高圧圧縮気体を供給し、次いでオンオフ・バルブを閉じた後に、弾丸を、自動ガンの高圧圧縮気体室に貯蔵された高圧圧縮気体を用いて噴射孔から発射する

ことを特徴とする遺伝子導入方法及びその装置が提供される。この方法及びその装置により、自動ガンに供給される高圧圧縮気体の量が制限されるため、安全性が確保される故、装置全体が小型化、軽量化、低コスト化され、また特に装置のノズル部分が小型化されるため、ノズルの軸方向に制限がなくなる結果、遺伝子担持微粒子の噴出方向に制限がなくなる。

【0010】また、飛出した微粒子の移動方向に沿った開孔を有するチャンバーをノズルに着脱自在に接続して具備することにより、飛出した微粒子に含まれる遺伝子の周囲への飛散が防止される。更に、チャンバーとノズルとの間に配置されたバックリングとノズルに対してチャンバーを固定するナットとを具備するため、ノズルに対するチャンバーの位置が容易に変えられ、それ故、ノズル先端の噴出孔とチャンバー内もしくはチャンバー近傍に配置されたターゲット細胞との間の距離、すなわち微粒子の噴出距離が容易に調整される。

【0011】更に、高圧圧縮気体の噴射時間を制御する制御手段を具備することにより、遺伝子導入に好適な短時間での噴射が確保される。また、このよう噴射時間の制御と高圧圧縮気体圧の制御を組み合わせることにより、ターゲット細胞の固さ等の性質に応じて、弾丸の発射速度及び微粒子の噴出速度も調整できる。

【0012】更にまた、オンオフ・バルブが閉じているときだけ、自動ガンの弁体が噴射孔から離れることを可能にする安全手段を具備することにより、安全性が確実に確保される。

【0013】また、ノズルの筒部の内面に設けられた弾性部材を具備することにより、弾丸が発射前にはノズル内により確実に保持されるとともに、弾丸のノズル内への装着が容易になる。

【0014】更に、ノズルの筒部の内面に設けられた可撓性のチューブとチューブ内の気体量を制御する制御手段を具備することにより、弾丸が発射前にはノズル内に確実に保持されるとともに、弾丸のノズル内への装着が容易になる。また、これに、高圧圧縮気体の噴射時間を制御する制御手段も具備する場合には、高圧圧縮気体の噴射による弾丸の発射と弾丸の取り外しが同調され、その結果、弾丸が発射前にはノズル内に確実に保持されるとともに、可撓性のチューブを繰り返し長期にわたって使用できる。

【0015】更にまた、弾丸の変形防止手段を具備することにより、弾丸の底面の形状とそれを制止するノズル先端のストップ部の形状がびったり適合するため、弾丸の損傷を防止でき、弾丸を繰り返し使用できる。

【0016】また、表面処理が施された本発明の弾丸により、微粒子が弾丸の表面から容易に分離されるため、弾丸表面から多量の微粒子が均一に飛出して細胞中に均一に打ち込まれ、その結果、微粒子に含まれる遺伝子が高い発現効率で細胞中に導入される。

【0017】

【発明の実施の形態】次に、添付図面を参照して本発明を説明する。

【0018】図2を参照して、遺伝子導入装置の第一の具体例に基づいて本発明を説明すると、この遺伝子導入装置は、高圧圧縮気体源11から供給される高圧圧縮気体を噴射する自動ガン12と、遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子13(図4)を付着させた弾丸14をストップ部15に衝突させる、自動ガン12の一端に取り付けられたノズル16と、このノズル16に着脱自在に接続されたチャンバー17と、高圧圧縮気体源11から自動ガン12に至るライン内に設けられた手で開閉するオンオフ・バルブ18と、高圧圧縮気体の噴射時間を制御するための噴射制御手段19とを具備している。

【0019】図3は自動ガン及びノズルの正面からみた断面図である。図3において、自動ガン12は、例えばエアレススプレー塗装用自動ガンであり、ノズル16にバックリング20を介して袋ナット21等により接続固定されるようになっている。この自動ガン12は、ノズル16側に高圧圧縮気体源11から供給される高圧圧縮気体を貯蔵する高圧圧縮気体室22と、作動用の低圧圧縮気体が供給される低圧圧縮気体室23とを備え、高圧圧縮気体室22と低圧圧縮気体室23とは分離壁24で分離されている。自動ガン12は、更に、高圧圧縮気体室22のノズル側端部に、下方に向かってテーパ状に形成されている弁座25を備え、この弁座25の下方に、高圧圧縮気体室22に貯蔵された高圧圧縮気体を噴射する噴射孔26も備えている。

【0020】また、自動ガン12の上端には、より上側に配置されたピストン(図示しない)とピストンバックリング27との間にスプリング28が配置されている。更に、上記弁座25を開閉して噴射孔26を開閉する弁部材、例えばニードル弁部材29が、分離壁24の中心に設けたバックリング31で押さえられて、自動ガン12の軸方向に沿って移動可能なように配置されている。そして、低圧圧縮気体室23に低圧圧縮気体が供給されない場合(オフ)には、スプリング28のスプリング力に押されてニードル弁部材29が弁座25を閉じるようになっている。一方、低圧圧縮気体室23に低圧圧縮気体が供給された場合(オン)には、低圧圧縮気体の圧力でスプリング28が圧縮され、ニードル弁部材29が上方方向に移動し、高圧圧縮気体がノズル16内に噴射され、弾丸14が発射されるようになっている。

【0021】図4はノズルの一態様を示す正面からみた一部断面図である。図4において、ノズル16は、例えばアルミニウム等の金属からなり、表面に遺伝子を担持させた遺伝子担持微粒子13をその一端(底面)に付着させた円筒形の弾丸14を、自身の先端から下端まで誘導するための筒部32と、筒部32の下端において弾丸14を制止するストップ部15と、遺伝子担持微粒子

13の飛出しを許容する、ストップ部15の中央側に位置された噴出孔33とを備えている。このストップ部15の内表面15aは、ノズル16の軸方向に対して垂直に平面に形成されている。

【0022】また、筒部32の上端の内面には、ゴム等の弾性部材、例えばOリング34を係合させるための凹部35が設けられている。Oリング34の内径部分は弾丸14の外径よりも小さくなっているため、Oリング34を弾丸14の側面とノズル16の凹部35との間に配置すると、弾丸14の装着を容易にし且つ発射前の弾丸14の保持を確実にできるようになっている。なお、弾性部材としてはOリング34に代えて、Uリングなど種々の部材を使用できる。

【0023】次に、図2を参照して、高圧圧縮気体のライン、低圧圧縮気体のライン並びに高圧圧縮気体の噴射時間を制御する制御手段である噴射制御手段19を順に説明する。

【0024】図2において、高圧圧縮気体源11から、空気、窒素、アルゴンその他の不活性気体等の高圧圧縮気体を10～250kg/cm<sup>2</sup>に調圧する高圧調整用レギュレータ41を経て、ラインが高圧圧縮気体用ラインと作動用の低圧圧縮気体用ラインの2つに分岐されている。一方の高圧圧縮気体用ラインは滅菌フィルター42、手動のオンオフ・バルブ18を経て自動ガン12の高圧圧縮気体室22（図3）に供給されるようになっている。

【0025】他方、低圧圧縮気体用ラインは、前記高圧調整用レギュレータ41で調整された高圧圧縮気体を2～7kg/cm<sup>2</sup>の低圧圧縮気体に調圧する低圧調整用レギュレータ43を経て、噴射制御手段19に導入されるようになっている。

【0026】上記噴射制御手段19は、予め設定された時間のみに蔵する電磁開閉弁（図示しない）が開いて予め設定された時間のみ低圧圧縮気体をNOT素子44に供給するコントローラー45、上側の急速排気弁46a及び下側の急速排気弁46bを有しコントローラー45に接続された空気作動弁47を含む。コントローラー45はスイッチ48を介して電源49に接続されている。

【0027】そして、コントローラー45は、スイッチ48を入れ、コントローラー45をオンすると、予め設定された短時間のみコントローラー45の電磁開閉弁（図示しない）が開くようになっている。この電磁開閉弁（図示しない）が開くと、低圧圧縮気体がNOT素子44に供給されてNOT素子44がオフになり、空気作動弁47の下側の急速排気弁の46bよりパイロットエアが排気される一方、上側の急速排気弁の46aにパイロットエアが入るため、空気作動弁47から低圧圧縮気体が自動ガン12の低圧圧縮気体室23に供給され、ニードル弁部材29が弁座25から離れ、高圧圧縮気体が

設定時間ノズル16に噴射するようになっている。

【0028】そして、設定された時間が経過し、コントローラー45の電磁開閉弁（図示しない）が閉じ、低圧圧縮気体のNOT素子44への供給が止まると、NOT素子44がオンになり、空気作動弁47の上側の急速排気弁46aがよりパイロットエアが排気される一方、空気作動弁47の下側の急速排気弁46bにパイロットエアが入り、空気作動弁47からの低圧圧縮気体の供給が止まり、自動ガン12の低圧圧縮気体室23と空気作動弁47との間における低圧圧縮気体が速やかに排気されるため、高圧圧縮気体の噴射が停止するようになっている。

【0029】図5は、ノズル及びチャンバーの一様様の正面からみた断面図（A）並びにナットの正面図（B）を示す。図5において、チャンバー17は、ノズル16の噴出孔33から飛出した遺伝子担持微粒子の移動方向に沿った開孔50を有するものであり、チャンバー17の上端側内面には、ゴム等の弾性部材からなるパッキング61を係合させるための凹部62が設けられている。

【0030】パッキング61をチャンバー17とノズル16との間に配置させて、袋ナット63とチャンバー17の上部のネジ59で締め付けてパッキング61を圧縮して、パッキング61をノズル16に圧接せしめて、ノズル16とチャンバー17を固定するようになっている。このようにパッキング61がノズル16に圧接されるので、ノズル16の軸方向に対してチャンバー17の位置を移動させた後に、ノズル16に対してチャンバー17を固定できるようになっている。これにより、ノズル16の噴出孔33からターゲット細胞までの距離、すなわち遺伝子担持微粒子13の噴出距離、を容易に変えることができるようになっている。

【0031】なお、使用するチャンバーはターゲット細胞に応じて、変えるのが好ましい。例えば、図6に図示するチャンバー17は、ターゲット細胞として生体それ自体を使用する場合（*in vivo*法）に好適に使用される。チャンバー17の下端部17aは、下側に向かって先細にテーパ状に形成され、下端が開口部17bとなっている。更に、チャンバー17の上側部には真空口64が設けられ、この真空口64はレギュレータ65（図2）を介して真空ポンプ66（図2）に接続されており、この真空口64は使用状況に応じて栓等により閉じることができるようになっている。

【0032】このチャンバー17を使用する場合には、生体67をチャンバー17の開口部17bの中央部に配置し、真空口64から減圧させながら遺伝子導入を行うようにし、チャンバー17内の空気抵抗を低減して、遺伝子担持微粒子13が円滑に細胞に打ち込まれるようにし、且つ遺伝子の周囲への飛散が防止されるようになっている。なお、この場合には図2に示されるように、生体67を、受け台68に固定されたパンチングメタル盤

69上のフェルト等からなるクッション70に配置することもできる。

【0033】他方、図7(A)に図示するチャンバー71は取出し細胞を使用する場合(in vitro法)に好適に使用される。この場合には、チャンバー71の内部下側には円筒状の受け台72が着脱自在に収納できるようになっており、チャンバー71の内面下側には、受け台72の側面を嵌合して収納するための凹部73が設けられている。

【0034】取出し細胞74は、図7(B)に図示するパンチングメタル盤75上に押さえリング76で押さえられて圧固定されたフェルト等からなるクッション77上に吸引固定されるようになっている。また、受け台72の中央下部には真空口78が設けられており、この真空口78には図2に図示する真空ポンプ66がレギュレータ65を介して接続されている。この場合チャンバー71の真空口は栓79で閉じられているか或いはチャンバー71には最初から真空口が設けられないようになっている。

【0035】図8はチャンバーの他の態様の正面からみた断面図である。このチャンバー81の下側には気体逃がし口82が設けられており、このチャンバー81を用いる際には真空ポンプ等で吸引する必要がなく、簡便に遺伝子導入を行うことができる。

【0036】次に、図2に図示する遺伝子導入装置の動作を説明する。

【0037】図5(A)及び図6に図示されるチャンバー17を用いる場合、ターゲット細胞の性質に応じて微粒子の噴出距離、すなわちノズル16の噴出孔33の下端からチャンバー17の開口部17bまでの距離、が最適となるように、ノズル16に対してチャンバー17を上下方向に移動させた後、チャンバー17を袋ナット63で固定しておく。

【0038】そして、ターゲット細胞として生体を使用する場合(in vivo法)、図6に図示するように、例えばターゲットとなる生体67をチャンバー17の開口部17bと接触させるように配置しておく。

【0039】また、図4に示されるように、底面に遺伝子担持微粒子13をエタノール溶液等で付着させた弾丸14の側面をOリング34で挟み、Oリング34をノズル11の凹部35に係合させて、弾丸14をノズル14の筒部32の内面に装着する。

【0040】次に、図2に示されるように、オンオフ・バルブ18を操作者が開き、高圧圧縮気体源11から高圧調整用レギュレータ41を経て10~250kg/m<sup>2</sup>に調整された後、滅菌フィルター42を経て清浄化された高圧圧縮気体を、自動ガン12の高圧圧縮気体室22に供給した後、オンオフ・バルブ18を操作者が閉じる。

【0041】次に、スイッチ48を入れて、予め電磁開

閉弁(図示しない)の作動時間を例えば約0.005秒に設定しておいたコントローラ45をオンにすると、設定された約0.005秒間のみ電磁開閉弁(図示しない)が開いて低圧調整用レギュレータ43により調圧された低圧圧縮気体がNOT素子44に流れ、NOT素子44がオフとなり、空気作動弁47の下側の急速排気弁46bよりパイロットエアが排気される一方、上側の急速排気弁46aに約0.005秒間パイロットエアが入るため、空気作動弁47が作動し、低圧圧縮気体が自動ガン12の低圧圧縮気体室23(図3)に供給される。

【0042】図3に示されるように、低圧圧縮気体室23に供給された低圧圧縮気体の圧力で、スプリング28が上方方向に押圧され、ニードル弁部材29が弁座25から離れて、高圧圧縮気体室22に供給されていた高圧用圧縮気体がノズル16内に噴射される。そして、図4に示されるように、この噴射により弾丸14がストップ部15に向かって加速されて発射され、ストップ部15の内表面15aに衝突した弾丸14の底面から、付着していた遺伝子担持微粒子13が衝撃力により分離して噴出孔33から高速で噴出する。そして、図6に示されるように、噴出した遺伝子担持微粒子13はチャンバー17の先端の開口部17bから生体67に衝突して生体67に打ち込まれ、遺伝子担持微粒子13上の遺伝子が生体67中に導入される。

【0043】次に、図2に示されるように、コントローラ45をオンにしてから約0.005秒後に、コントローラ45の電磁開閉弁(図示しない)が閉じ、低圧圧縮気体のNOT素子44への供給が止まると、NOT素子44がオンとなり、空気作動弁47の上側の急速排気弁46aよりパイロットエアが排気されると同時に、空気作動弁47の下側の急速排気弁46bにパイロットエアがNOT素子44から供給されるため、空気作動弁47が停止して、自動ガン12の低圧圧縮気体室23と空気作動弁47との間における低圧圧縮気体は空気作動弁47から急速に排気され、図3に示されるように自動ガン12のスプリング28が伸張して、ニードル弁部材29が下方方向に移動して弁座25を直ちに閉じるので、高圧圧縮気体の噴射時間を0.005秒程度の短時間に制御することが可能である。

【0044】そして、遺伝子導入の際の弾丸14の速度は約400~700m/秒程度であり、遺伝子担持微粒子13の噴出(飛出)速度は約10~200m/秒程度であるので、プロトプラスト化していない比較的固い植物細胞等にも、遺伝子を直接導入することが可能である。

【0045】また、上記のように、手動のオンオフ・バルブ18を開き、高圧圧縮気体を自動ガン12に供給し、次いでオンオフ・バルブ18を閉じた後、自動ガン12を作動させるため、オンオフ・バルブ18から自動



ガン12に至るラインの高圧圧縮気体の量が制限される。このため、自動ガン12には所定量以上の高圧圧縮気体が導入されることがなく、たとえコントローラー45が故障した場合であっても過度の高圧圧縮気体による暴発が防止され、安全性が確保される。

【0046】このように、本発明の遺伝子導入装置は安全性が高いので、装置の大きさを従来の装置よりも大幅に小型化でき、軽量化でき、コストを低減できる。

【0047】また、このような装置全体の小型化に伴い、例えばノズル16の大きさを内径5mm、長さ50mm～100mm程度に、及びチャンバー17の大きさを内径15mm～30mm、長さ50mm～100mm程度まで小型化でき、ターゲット細胞の位置に応じてノズル軸の方向を変えることが容易であり、それ故遺伝子担持微粒子の噴出方向を変えることが容易であり、生体に遺伝子を導入すること(in vivo法)が可能である。

【0048】更に、ターゲット細胞の固さ等の性質に応じて、上記のように遺伝子担持微粒子の噴出距離を簡単に調整できることに加えて、弾丸14を発射させるための高圧圧縮気体の噴射量及び噴射速度についても、コントローラー45による高圧圧縮気体の噴射時間の制御の他に、高圧調整用レギュレータ41の調圧、オンオフ・バルブ18から自動ガン12までのラインの距離の変動により簡単に調整できるため、本発明の遺伝子導入装置は柔らかい細胞から固いプロトプラスト化されていない植物細胞に至る広範囲の細胞に使用することができる。

【0049】更にまた、弾丸14はOリング34に挟まれて確実にノズル16に保持されるので、弾丸14のノズル16への装着が容易であるとともに、弾丸14の発射前に取外される危険がない上に、高圧圧縮気体の噴射により弾丸14は確実に発射される。このように弾丸14がノズル16に確実に保持されるため、弾丸14の発射方向、ひいては遺伝子担持微粒子13の噴出方向が水平方向に制限されることはない。

【0050】なお、図2において、ノズル16は上下方向に配置されているが、例えば自動ガン12またはノズル16を回動自在に遺伝子導入装置に取付けるなどして、ノズル16の方向を自在に変えることも可能である。このようにノズル16の方向を自在に変えることができれば、特に生体のままで細胞に遺伝子を導入する場合(in vivo法)に好適である。

【0051】更にまた、図4に示されるように、円筒状の弾丸14がノズル16のストップ部15の内表面15aに衝突する際に、ストップ部15の内表面15aの形状が弾丸14の底面とぴったり適合するので、衝突による弾丸14の変形や損傷が従来よりも低減され、弾丸14を繰り返し使用することが可能である。

【0052】また、図5(A)及び図6に示されるように、遺伝子担持微粒子の噴出はチャンバー17内で行わ

れるので、遺伝子の周囲への飛散が有効に防止される。更に、遺伝子担持微粒子が噴出する際には、チャンバー17の真空口64からチャンバー13内の空気が真空ポンプ66により吸引されて減圧されるため、空気抵抗が低減し、遺伝子担持微粒子が確実に噴出されるとともに、遺伝子の周囲への飛散がより有効に防止される。

【0053】なお、上記ではin vivo法の場合について説明したが、本発明はin vitro法にも適用できるのはもちろんであり、この場合も例えば図7(A)に示されるように、取り出し細胞74を固定した受け台72の真空口78からチャンバー17内の空気が吸引され、上記と同様に空気抵抗が低減し、遺伝子担持微粒子が確実に噴射され、遺伝子の周囲への飛散がより有効に防止される。

【0054】次に、図9を参照して、遺伝子導入装置の第2の具体例に基づいて本発明を説明する。なお、図9に図示する第2の具体例については、図2に図示する具体例の種々の構成要素に対応する構成要素に対して、図2の種々の構成要素に用いた参照番号に夫々100を加えた参照番号を用いている。

【0055】図9に図示する遺伝子導入装置は、上記図2に図示する遺伝子導入装置の安全性を更にグレードアップのための安全手段、例えば、手で開閉するオンオフ・バルブ118が閉じている場合だけ、自動ガン112からの高圧圧縮気体の噴射を可能にする安全回路151を備えている。この安全回路151は、上記低圧圧縮気体用ラインとコントローラー145との間に設けられ、オンオフ・バルブ118が閉じている状態で作動するローラカム形作動弁152と、第1のポート①と第2のポート②とを有するAND素子153と、空気作動弁154とを備えている。

【0056】そして、図9に示されるように、オンオフ・バルブ118が閉じた状態では、ローラカム形作動弁152が開いて、AND素子153の第2のポートに低圧圧縮気体が供給されるため、AND素子153が作動し、空気作動弁154が作動し、コントローラー145に低圧圧縮気体が供給されるようになっている。

【0057】一方、オンオフ・バルブ118が開いた状態では、図10に示されるように、ローラカム形作動弁152が閉じて、AND素子153の第2のポートに低圧圧縮気体が供給されず、AND素子153が作動しないため、空気作動弁154も開かないようになっている。このため、空気作動弁154からコントローラー145に低圧圧縮気体が供給されず、スイッチ148をオンにし、コントローラー145をオンにしても、低圧圧縮気体はNOT素子144に流れず、低圧圧縮気体が自動ガン112に供給されないようになっている。

【0058】次に、図9に図示する遺伝子導入装置の動作を説明する。

【0059】上記第1の具体例と同様に、細胞167を

チャンバー117の下側の位置に配置すると共に、弾丸114をノズル116の内面に装着しておく。

【0060】そして、操作者がオンオフ・バルブ118を開いて高圧圧縮気体を自動ガン112に供給した後、オンオフ・バルブ118を閉じる。

【0061】このようにオンオフ・バルブ118を閉じた状態では、ローラカム形作動弁152が開いて、AND素子153の第2のポートに低圧圧縮気体が供給され、AND素子153が作動して、空気作動弁154が開いて、コントローラー145に低圧圧縮気体が供給される。

【0062】したがって、次に、スイッチ148を入れて、コントローラー145をオンにすると、低圧圧縮気体がNOT素子144に流れ、NOT素子144がオフとなり、低圧圧縮気体が自動ガン112に供給され、高圧圧縮気体がノズル116内に噴射され、弾丸114が発射され、この結果、弾丸114の表面に付着された遺伝子担持微粒子が細胞167内に打ち込まれ、遺伝子担持微粒子上の遺伝子が細胞167内に導入される。

【0063】次に、上記遺伝子導入操作を繰り返しているうちに、操作者が誤ってオンオフ・バルブ118を開いたままスイッチ148を入れて、コントローラー145をオンにしても、図10に示されるように、ローラカム形作動弁152が閉じているので、AND素子153の第2のポートに低圧圧縮気体が供給されず、AND素子153が作動しないため、空気作動弁154も作動せず、低圧圧縮気体はNOT素子144に流れず、低圧圧縮気体が自動ガン112に供給されず、高圧圧縮気体が噴射されることはない。

【0064】上記のように安全回路151を設けた場合には、操作者がオンオフ・バルブ118を開いたまま誤ってスイッチ148を入れたとしても、高圧圧縮気体の噴射が防止されるので、安全性がより確実に確保される。

【0065】なお、安全手段としては、上記安全回路151以外の他の手段を用いてもよい。

【0066】次に、図11を参照して、遺伝子導入装置の第3の具体例に基づいて本発明を説明する。なお、図11に図示する第3の具体例については、図2に図示する具体例の種々の構成要素に対応する構成要素に対して、図2の種々の構成要素に用いた参照番号に夫々200を加えた参照番号を用いている。

【0067】図11に図示する遺伝子導入装置は、弾丸保持手段として前記Oリング34に代えて、ノズル216の筒部232の内面に設けられた可撓性のチューブ283と、チューブ283内の気体量を制御する制御手段、例えばこの気体量を制御することにより弾丸214の着脱を制御する弾丸着脱制御手段284を備えている。この弾丸着脱制御手段284は、低圧調整用レギュレーター243からチューブ283に至るライン内に設

けられ、手動で開閉するバルブ285も備えている。

【0068】そして、図12において、チューブ283の内径は、気体を供給されたときには弾丸214外径よりも小さく、気体が排気されたときには弾丸214の外径よりも大きくなっている。

【0069】また、ノズル216の上部内面には凹部286が設けられ、この凹部286にチューブ283が固定され、チューブ283を気体で膨張させて弾丸214を側面から保持するようになっている。

【0070】図11に図示する弾丸着脱制御手段284は、噴射制御手段219と共用される、スイッチ248に接続されたコントローラー245、並びに弾丸着脱制御手段284単独で使用される、上側の急速排気弁287a及び下側の急速排気弁287bを有する空気作動弁288、マフラー289及びNOT素子290を備えている。

【0071】そして、バルブ285を開くと、低圧調整用レギュレーター243により調圧された低圧圧縮気体がチューブ283に供給できるようになっている。また、作動弁288及びNOT素子290は、コントローラー245に接続され、噴射制御手段219と弾丸着脱制御手段284とを同調させるようになっており、すなわち弾丸214の発射と、チューブ283内の低圧圧縮気体の排気による弾丸214の取外しとを同調させるようになっている。

【0072】次に、図11に図示する遺伝子導入装置の動作を説明する。

【0073】上記第1の具体例と同様に、チャンバー217をノズル216の軸方向に対して調整して固定し、細胞267をチャンバー217の下側に配置すると共に、遺伝子担持微粒子を付着させた弾丸214をノズル216の内面に装着しておく。

【0074】そして、バルブ285を操作者が開くと、NOT素子290がオンの状態であり、空気作動弁288の下側の急速排気弁287bよりパイロットエアが供給され、低圧調整用レギュレーター243により調圧された低圧圧縮気体が、空気作動弁288を流れて、チューブ283内に供給される。

【0075】次に膨張したチューブ283に弾丸214(図12)を装着すると、弾丸214は膨張したチューブ283によりしっかりと保持される。なお、チューブ283を膨張させる前に、予め弾丸214をチューブ283に配置しておいて装着することもできる。

【0076】次に、スイッチ248を入れてコントローラー245をオンすると、NOT素子290がオフになり、空気作動弁288の上側の急速排気弁287aにパイロットエアが供給される一方、下側の急速排気弁287bよりパイロットエアが排気されるため、チューブ283と空気作動弁288との間における低圧圧縮気体が空気作動弁288から排気され、チューブ283から低

圧縮気体が約0.005秒間排気され、弾丸214が取外される。このとき、コントローラ245のオンにより、高圧圧縮気体の噴射と弾丸214の取外しとが同調するため、弾丸214は取外しと同時に発射され、ノズル216のストップ部215に衝突した弾丸214から噴出した遺伝子担持微粒子が細胞に打ち込まれ、遺伝子が細胞中に導入される。

【0077】次に、コントローラ245をオンにしてから約0.005秒後に、NOT素子290より再びパイロットエアが供給されるため、空気作動弁288の下側の急速排気弁287bよりパイロットエアが空気作動弁288に入り該空気作動弁288が作動して、チューブ283内に再び低圧圧縮気体が供給される。これにより、再び弾丸214の装着が可能になる。

【0078】このように噴射制御手段219と弾丸着脱制御手段284とを同調させることにより、高圧圧縮気体の噴射前における弾丸214の離脱をより確実に防止できるとともに、高圧圧縮気体の噴出時の弾丸214の取外しを確実に且つ円滑に行うことができ、長期にわたって安定して弾丸214を着脱できる。

【0079】次に、表面処理が施された弾丸について説明する。この表面処理は、遺伝子担持微粒子を付着させる弾丸の表面に関して、微粒子を弾丸の表面から容易に分離させる目的で行われるものであり、表面処理の種類としては、フッ素樹脂・コーティング、粗面化処理、化学的処理等が挙げられる。

【0080】フッ素樹脂・コーティングは、例えばポリテトラフルオロエチレン（テフロン）等の耐衝撃性が高く、撥水性のフッ素樹脂ポリマーを、弾丸の微粒子を付着させる表面にコーティングして行う。上記したように遺伝子担持微粒子はエタノール溶液等のアルコール（親水性）で付着されているので、コーティングされたフッ素樹脂ポリマーの撥水力により、微粒子が弾丸の表面から容易に分離する。コーティングの厚さは、好適には20～30μmである。

【0081】また、粗面化処理は、弾丸の表面を、例えば#200～#1000のサンドペーパーで削ることにより行い、これにより、弾丸の表面が、凹凸に粗面化され、小さな空隙が多数形成される。各々の空隙の大きさは、遺伝子担持微粒子が捕捉されない程度に小さいため、微粒子は、小さな空隙が多数形成された表面に反発して、弾丸の表面から容易に分離される。

【0082】更に、化学的処理は、弾丸の表面に、ジメチルシリレン基 $[=Si(CH_3)_2]$ 、トリメチルシリル基 $[-Si(CH_3)_3]$ 等の珪素とメチル基を含む化合物で処理することにより行う。すなわち、弾丸材料の金属に結合し易い珪素を弾丸の表面側に結合させ、この珪素を介して疎水性のメチル基も結合させることにより、このメチル基（疎水性）が微粒子の付着に用いられるアルコール（親水性）と反発するので、微粒子は弾丸

の表面から容易に分離される。

【0083】上記の表面処理は単独であっても組み合わせで行ってもよいが、フッ素樹脂・コーティングが特に好適である。

【0084】上記の表面処理を弾丸の表面に施すことにより、遺伝子担持微粒子の噴出及び細胞への打ち込みが均一にばらつきなく安定に行われ、遺伝子の導入効率、すなわち発現効率を高めることができる。

【0085】なお、前記表面処理を施した弾丸は本発明に従う遺伝子導入装置に使用することが好ましいが、この遺伝子導入装置への使用に限定されることなく、種々のパーティクル・ガン法に使用できることはいうまでもない。

【0086】また、図7、図9及び図11に図示するように低圧圧縮気体を高圧圧縮気体源から分岐して導入する代わりに、コンプレッサ等から低圧圧縮気体を別途導入することも可能である。しかし、図7、図9及び図11に図示するように低圧圧縮気体を高圧圧縮気体源から分岐して導入すると、1個の高圧ボンベだけで間にあうので、遺伝子導入装置の設置場所が最小限で済み、病院、研究室等で手軽に遺伝子導入装置を手軽に取り扱うことができ便利である。

【0087】

【実施例】以下の実施例により本発明を更に詳細に説明する。

#### 【0088】実施例1～4（弾丸の表面処理）

##### 実施例1

円筒状の弾丸（直径4.8mm、高さ5mm、アルミニウム製）に、フッ素・コーティングを以下のように施した。弾丸の一面にテフロン層20～30μmをコーティングした弾丸を得た。この弾丸を、以下弾丸Aという。

##### 【0089】実施例2

実施例1で使用した弾丸と同様の弾丸に、粗面化処理を以下のように施した。弾丸の一面を#600のサンドペーパーで削り、表面に多数の空隙を形成した。この弾丸を、以下弾丸Bという。

##### 【0090】実施例3

実施例2で得た弾丸Bの粗面化した表面に、さらに実施例1と同様にテフロン・コーティングを施した。この弾丸を、以下弾丸Cという。

##### 【0091】実施例4

実施例1で使用した弾丸と同様の弾丸に、メチル基処理を以下のように施した。50%アルコキシシラン溶液に弾丸の一面に約1分間浸漬した後、乾燥し、メチル基処理した弾丸を得た。この弾丸を、以下弾丸Dという。

#### 【0092】実施例5～6（遺伝子導入）

実施例1～4で得た表面処理を施した弾丸A、B、CおよびDならびに表面処理を施さない弾丸Eを使用して、遺伝子導入を以下に行った。

##### 【0093】実施例5

弾丸保持手段としてチューブを用いた場合の図11に示すような本発明の装置において、内径2mm長さ5mmの噴出孔を有する、内径5mm長さ50mmの図3に示すようなアルミニウム製ノズルに、図5(A)および図6に示されるような内径2.4mm長さ75mmのプラスチック製チャンバーを装着し、ノズル先端からチャンバー先端までの距離を30mmに調整した。

【0094】一方、pSVGal、pSVlucまたはpSVsec-lucの遺伝子を粒径1 $\mu$ mのタングステン微粒子表面に付着させ、エタノール溶液に懸濁させ、該懸濁液をマイクロシリンダーで弾丸A、B、CおよびDの表面処理を施した面ならびに弾丸Eの底面の中央部に夫々付着させた。次に、図11に示したような手動の開閉バルブを開き、チューブを膨張させ、各弾丸をチューブ内に装着した。また、動物細胞としてマウス精巣細胞を図7(B)に示すような受け台のクッション上に固定し、チャンバーの先端に配置した。

【0095】次に、オンオフ・バルブを操作者が開いて、N<sub>2</sub>ガスボンベよりのN<sub>2</sub>の圧力を高圧調整用レギュレータ(テレコム社製、44-1115)で50~100kg/cm<sup>2</sup>に調圧した高圧圧縮気体をエアレススプレー塗装用自動ガンに供給した後、オンオフ・バルブを閉じる。その後、電磁弁を内蔵するコントローラー(岩崎エンジニアリング社製、AD3000V)により電磁弁作動時間を予め0.005秒に設定し、前記高圧圧縮気体を低圧調整用レギュレータ(テレコム社製、44-1115-24)での低圧圧縮気体を5kg/cm<sup>2</sup>に調圧してコントローラー側の作動用圧縮気体とし、コントローラーをオンにして、高圧圧縮気体の噴射による弾丸の発射と図9に示すような弾丸着脱制御手段になる弾丸の取外しを同調させるようにして、前記チャンバー内を真空ポンプで減圧状態にしなが、遺伝子担持微粒子を前記マウス精巣細胞に直接(in vivo法で)打ち込んだ。その結果、遺伝子担持微粒子上の遺伝子が、細胞に、弾丸A、B、CおよびDについては50%程度、弾丸Eについては5%導入された。

【0096】なお、各弾丸は、それぞれ数回繰り返して使用できることが分かった。

#### 【0097】実施例6

弾丸保持手段としてチューブに代えて図3に示されるようなOリングを用い、弾丸着脱制御手段を用いず、図2に示されるような遺伝子導入装置を用い、弾丸Cのみを用いた以外は、実施例5と同様にして遺伝子担持微粒子をマウス精巣細胞に直接(in vivo法で)打ち込んだ。その結果、遺伝子担持微粒子上の遺伝子が、細胞に50%程度導入された。

#### 【0098】実施例7

取出しマウス精巣細胞を図7(B)に示されるような受け台(内径40mm、高さ40mm)のフェルト製のクッション上に固定し、この受け台を図7(A)、に示さ

れるようなプラスチック製チャンバー(内径15mm、高さ55mm)に収納し、ノズル先端と細胞との距離を30mmとした。

【0099】そして、受け台の真空口に真空ポンプを接続し、弾丸Cのみを用いた以外は、実施例5と同様にして遺伝子担持微粒子を前記マウス精巣細胞に(in vivo法で)打ち込んだ。その結果、遺伝子担持微粒子上の遺伝子が、細胞に50%程度導入された。

#### 【0100】

【発明の効果】本発明の遺伝子導入方法及びその装置によれば、取扱いが容易で、安全性を確保でき、装置全体が小型化、軽量化、低コスト化でき、特に装置のノズルが小型化できるため、ノズルの軸方向については遺伝子担持微粒子の噴出方向に制限がなくなり、柔らかな細胞から固い(プロトプラスト化されていない)植物細胞に至る広範囲の細胞に遺伝子を導入でき、しかも生体(in vivo法)及び取り出し細胞(in vitro法)にも遺伝子の導入ができ、しかも、本発明の実施例ではリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リボゾーム法等の他の遺伝子導入方法と比較してin vitro法で2倍程度、in vivo方法で10倍程度遺伝子の導入効率が高いことが確認され、本発明の遺伝子導入方法及びその装置は遺伝子治療に好適に適用できる。

【0101】また、チャンバーをノズルに着脱自在に接続して設けることにより、遺伝子の周囲への飛散を防止できる。更に、チャンバーとノズルとの間に配置されたパッキングとノズルに対してチャンバーを固定するナットを具備することにより、ターゲット細胞に応じて微粒子の噴出距離を容易に調整できる。

【0102】本発明の高圧圧縮気体の噴射時間を制御する制御手段を具備する遺伝子導入装置によれば、遺伝子導入に好適な短時間での噴射を確保でき、また、このような噴射時間の制御と高圧圧縮気体圧の制御を組み合わせることにより、ターゲット細胞の固さ等の性質に応じて、弾丸の発射速度については微粒子の噴出速度も調整できる。

【0103】本発明の安全手段を設けた遺伝子導入装置によれば、安全性をより確実に確保できる。

【0104】本発明の弾性部材を具備する遺伝子導入装置或いは本発明の可撓性のチューブとチューブ内の気体量を制御する制御手段を具備する遺伝子導入装置によれば、弾丸を容易に装着できるとともに弾丸を確実に保持できる。また、高圧圧縮気体の噴射時間を制御する制御手段と、可撓性のチューブと、チューブ内の気体量を制御する制御手段とを具備することにより、高圧圧縮気体の噴射による弾丸の発射と弾丸の取外しとを同調させることができ、弾丸の保持手段を長期にわたって安定して使用できる。

【0105】本発明の弾丸の変形防止手段を具備する遺

伝子導入装置によれば、弾丸の変形を防止でき、弾丸を繰り返し使用できる。

【0106】本発明の表面処理が施された弾丸によれば、高い発現効率で遺伝子を細胞に導入できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来のノズルの正面からみた断面図。

【図2】本発明の遺伝子導入装置の一態様の概略図。

【図3】自動ガンおよびノズルの正面からみた一部断面図。

【図4】ノズルの一態様を示す正面からみた断面図。

【図5】ノズルおよびチャンバーの一態様の正面からみた断面図(A)ならびにナットの正面図(B)。

【図6】チャンバーの一態様および生体の正面からみた断面図。

【図7】チャンバーの他の態様及び受け台の正面からみた断面図(A)並びに(A)の受け台の一部拡大斜視図(B)。

【図8】チャンバーの更に他の態様の正面からみた断面図。

【図9】本発明の遺伝子導入装置の他の態様の概略図。

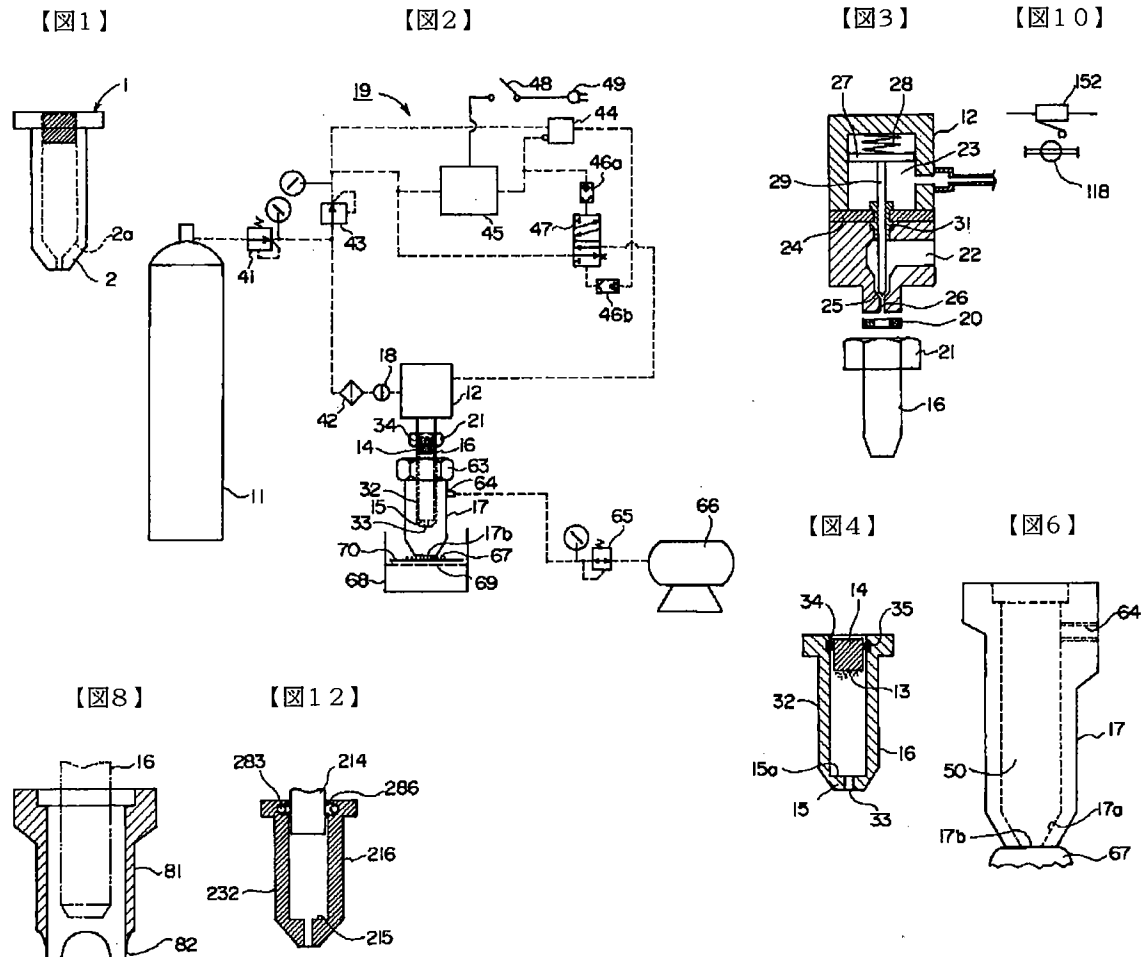
【図10】オンオフ・バルブ及びローラカム形作動弁の概略図。

【図11】本発明の遺伝子導入装置の更に他の態様の概略図。

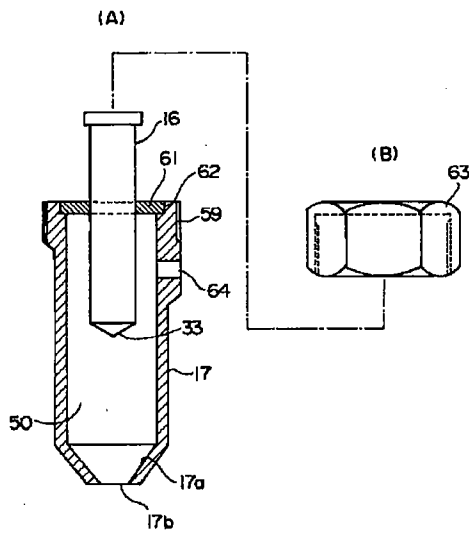
【図12】ノズルの他の態様を示す正面からみた断面図。

【符号の説明】

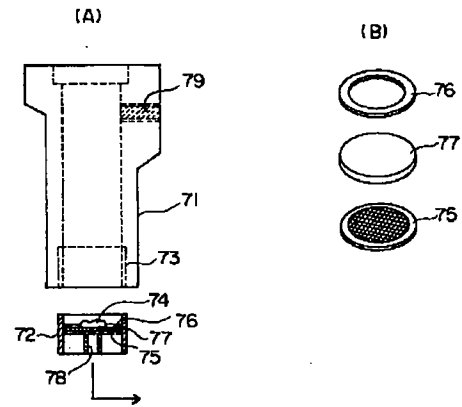
- 11 高圧圧縮気体源
- 12 自動ガン
- 13 遺伝子担持微粒子
- 14 弾丸
- 15 ストップ部
- 16 ノズル
- 18 オンオフ・バルブ
- 19 制御手段
- 32 筒部
- 44 NOT素子
- 45 コントローラー
- 47 空気作動弁



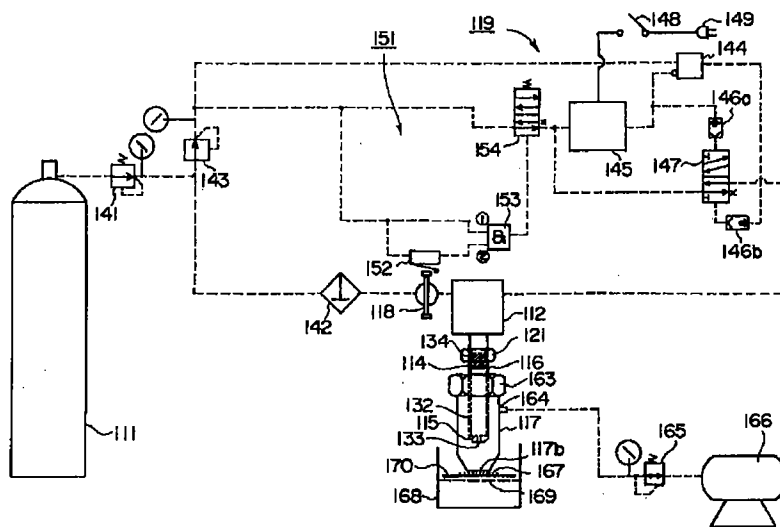
【図5】



【図7】



【図9】



【図11】

